3 月 March
2019，62(3)：334 – 342
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http：//www. insect. org. cn
doi：10. 16380/j. kcxb. 2019. 03. 007

乙基多杀菌素和联苯肼酯对地熊蜂的毒性及风险评估

王　欢，徐希莲*

（北京市农林科学院植物保护环境保护研究所，北京 100097）

摘要：【目的】明确乙基多杀菌素和联苯肼酯对地熊蜂 *Bombus terrestris* 的毒性，探讨这两种农药亚致死浓度对地熊蜂体内乙酰胆碱酯酶(AchE)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和羧酸酯酶(CarE) 3 种解毒酶活性的影响。【方法】采用饲喂法测定 60 g a. i. /L 乙基多杀菌素和 43% 联苯肼酯对地熊蜂采集蜂的急性经口毒性，依据农药对蜜蜂生态风险的危害熵(hazard quotient，HQ)值评估这两种农药对地熊蜂的风险。同时测定了这两种农药亚致死剂量(LD_{50}和 LD_{80})处理后地熊蜂 AchE，GST 和 CarE 的活性变化。【结果】60 g a. i. /L 乙基多杀菌素和 43% 联苯肼酯对地熊蜂采集蜂的急性经口毒性测定 48 h 时 LD_{50}值分别为 3. 590 和 1 447 μg a. i. /蜂，其中 60 g a. i. /L 乙基多杀菌素表现为中毒，43% 联苯肼酯表现为低毒。两种农药对地熊蜂采集蜂的 HQ 值均低于 50，表现为低风险。LD_{50}和 LD_{80}剂量的乙基多杀菌素处理组与对照组相比，3 h 时地熊蜂 AchE 活性被激活，显著高于对照组($P<0.05$)，分别为对照组的 1. 45 和 1. 23 倍，24 h 后活性受到抑制，两个剂量处理组 AchE 活性均显著低于对照组($P<0.05$)；CarE 活性 3 h 时同样被激活，显著高于对照组($P<0.05$)，LD_{50}和 LD_{80}剂量处理组 CarE 活性分别为对照组的 1. 24 和 1. 53 倍，24 h 后活性受到抑制，其中 LD_{50}剂量处理组 CarE 活性显著低于对照组($P<0.05$)，LD_{80}剂量处理组 CarE 活性与对照组差异不显著($P>0.05$)；LD_{50}和 LD_{80}剂量处理组 GST 活性 3 h 被激活，显著高于对照组($P<0.05$)，分别为对照组的 2. 24 和 2. 58 倍，24 h 后活性降低，但两个剂量处理组 GST 活性仍显著高于对照组($P<0.05$)。43% 联苯肼酯处理后，与对照组相比 3 h 时 LD_{50}和 LD_{80}剂量处理组 AchE 活性与对照组差异不显著($P>0.05$)，24 h 后 AchE 活性降低，显著低于对照组($P<0.05$)，分别是对照组的 75% 和 80%；CarE 活性 3 h 时被抑制，LD_{50}剂量处理组 CarE 活性显著低于对照组($P<0.05$)，LD_{80}剂量处理组 CarE 活性低于对照组，但差异不显著($P>0.05$)，24 h 后 CarE 活性被激活，其中 LD_{50}剂量处理组 CarE 活性高于对照组，但差异不显著($P>0.05$)，LD_{80}剂量处理组 CarE 活性显著高于对照组($P<0.05$)；LD_{50}剂量处理组 GST 活性 3 h 时被激活，显著高于对照组($P<0.05$)，24 h 后活性降低，但仍显著高于对照组($P<0.05$)，3 h 和 24 h 的活性分别为对照组的 2. 04 和 1. 72 倍，LD_{80}剂量处理组 3 h 的 GST 活性与对照组无显著差异($P>0.05$)，24 h 后活性降低，显著低于对照组($P<0.05$)。【结论】乙基多杀菌素和联苯肼酯对地熊蜂的 HQ 评估均表现为低风险，其中联苯肼酯对地熊蜂的安全性较高，在熊蜂授粉过程中可以按照推荐剂量应用，但过量施用或者长期施用可能会造成熊蜂体内药剂积累引起生理或者行为的变化，乙基多杀菌素在温室及大田授粉期的使用剂量和方法有待进一步研究。

关键词：地熊蜂；农药；乙基多杀菌素；联苯肼酯；安全性评价；乙酰胆碱酯酶；谷胱甘肽-S-转移酶；羧酸酯酶

中图分类号：Q965. 9　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2019)03-0334-09

基金项目：北京市科技计划项目(D17110500160000)；北方果树病虫害绿色防控北京市重点实验室(BZ0432)；北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJCX20170107)

作者简介：王欢，女，1986 年 11 月生，河北承德人，助理研究员，从事熊蜂生物学及授粉应用研究，E-mail：wanghuan111986@163. com

* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：xuxilian@ aliyun. com

收稿日期 Received：2018-08-29；接受日期 Accepted：2018-12-31

Toxicity and risk of spinetoram and bifenazate to bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae)

WANG Huan, XU Xi-Lian* (Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: 【Aim】This study aims to clarify the toxicities of spinetoram and bifenazate to bumblebee *Bombus terrestris*, and to explore the effect of sublethal doses of these two pesticides on the activities of three detoxifying enzymes including acetylcholinesterase (AchE), glutathione-S-transferase (GST), and carboxylesterase (CarE). 【Methods】The acute oral toxicities of 60 g a. i. /L spinetoram and 43% bifenazate to the foragers of *B. terrestris* were measured by feeding method. The risk of the two insecticides to *B. terrestris* was assessed based on the hazard quotient (HQ) values for the ecological risk of insecticides to bees. The changes in the activities of AchE, GST and CarE in foragers of *B. terrestris* treated with the two pesticides at sublethal doses (LD_{50} and LD_{80}) were assayed. 【Results】The LD_{50} values of 60 g a. i. /L spinetoram and 43% bifenazate against foragers of *B. terrestris* at 48 h after oral exposure were 3.590 and 1 447 μg a. i. per bee, respectively. Spinetoram at the dose of 60 g a. i. /L showed moderate toxicity to foragers of *B. terrestris*, while 43% bifenazate showed low toxicity. The HQ values of the two insecticides to foragers of *B. terrestris* were both below 50, suggesting that the two insecticides present low risk to this bumblebee species. The AchE activities in bees treated with LD_{50} and LD_{80} of spinetoram were significantly enhanced at 3 h ($P<0.05$), with a 1.45- and 1.23-fold increase as compared to the control group, respectively. Subsequently, the AchE activities in both the dose groups were inhibited after 24 h, and were significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). The CarE activities in bees treated with LD_{50} and LD_{80} of spinetoram were also significantly higher in the first 3 h after treatment, being 1.24- and 1.53-fold higher than that in the control group, respectively, and then inhibited after 24 h. At 24 h after treatment, the CarE activity in the LD_{50} dose group was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$), but that in the LD_{80} dose group showed no significant difference from that in the control group ($P>0.05$). The GST activities in bees treated with LD_{50} and LD_{80} of spinetoram were also activated at 3 h after treatment ($P<0.05$), with a 2.24- and 2.58-fold increase as compared to the control group, respectively. At 24 h after treatment, the GST activities in both dose groups decreased, but were still significantly higher than that in the control groups ($P<0.05$). The AchE activities in bees were treated with LD_{50} and LD_{80} of 43% bifenazate within 3 h showed no significant differences from that in the control group ($P>0.05$), but reduced to 75% and 80% of that in the control group after 24 h, respectively ($P<0.05$). The CarE activities in the both dose groups were inhibited after 3 h. The CarE activity in bees treated with LD_{50} of bifenazate for 3 h was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$), whereas that in bees treated with the LD_{80} dosage showed no significant difference from that in the control group ($P>0.05$). The CarE activities in bees treated with LD_{50} and LD_{80} of bifenazate for 24 h were activated, and the LD_{80} dose group had a significantly higher level of CarE activity than that in the control group ($P<0.05$), but the CarE activity in the LD_{50} dose group showed no significant difference from that in the control group ($P>0.05$). The GST activities in bees treated with LD_{50} of bifenazate increased at first ($P<0.05$), and then decreased. The GST activities in bees treated with LD_{50} of bifenazate for 3 h and 24 h were 2.04- and 1.72-fold higher than that in the control group, respectively ($P<0.05$). The GST activity in the LD_{80} dose group was not significantly different from that in the control group in the first 3 h ($P>0.05$), but was inhibited after 24 h and significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). 【Conclusion】The results demonstrate that spinetoram and bifenazate have low risk to the foragers of *B. terrestris* as judged by the HQ value. The safety of bifenazate to *B. terrestris* is higher, so it can be used in pollination period

according to the recommended dosage and method. However, the excessive and long-term application of bifenazate may affect the physiology and behavior of bumblebees. The dosage and method of application of spinetoram during the pollination period need to be further explored.

Key words: *Bombus terrestris*; pesticide; spinetoram; bifenazate; safety evaluation; acetylcholinesterase; glutathione-S-transferase; carboxylesterase

熊蜂是蜜蜂科(Apidae)熊蜂属 *Bombus* 的昆虫,具有声震大、花粉采集力强、耐低温、耐高湿以及趋光性差等优点,是众多农作物和野生植物的重要传粉昆虫。熊蜂授粉技术是目前国际上为设施果菜授粉最先进的技术之一,可以实现设施农业的优质、高效和安全生产(Dogterom *et al*., 1998; Gabriel *et al*., 2013)。随着我国熊蜂基础研究的深入和工厂化生产条件的成熟,熊蜂在温室设施内的应用越来越普遍(Velthuis and Kevan, 2002)。然而,温室设施内高温、高湿、密闭的环境使得病虫害发生较为严重,种植者常用化学农药防治病虫害以保证作物产量,直接影响了熊蜂的使用。

近年来,因农药中毒造成传粉昆虫数量骤降的报道屡见不鲜,生物安全问题受到了全球的普遍关注。2006 年,蜂群崩溃失调病(colony collapse disorder, CCD)席卷了美国、法国、瑞典、德国和澳大利亚等国,致使当地蜂农蜂群损失达 50% ~90%(苏松坤等, 2007)。诱发 CCD 现象的因素可能是栖息地退化、环境变化、营养缺乏、农药的亚致死效应以及蜜蜂疾病等(Cox-Foster *et al*., 2007; Oldroyd, 2007; Higes *et al*., 2008; Dhruba, 2009; Goulson *et al*., 2015; Shi and Liu, 2016),虽然目前还没有明确的答案,但普遍认为杀虫剂可能是引起 CCD 的主要因素之一。低毒农药的使用推广,在某些程度上缓解了高毒农药引起的蜜蜂急性中毒,但低毒农药的亚致死效应会带来一系列潜在的影响(王康等, 2017),即使降低亚致死剂量,同样会影响蜜蜂的采集行为能力、学习记忆能力、蜂群发展以及病原体的易感性等(Wu *et al*., 2011; Gill *et al*., 2012; Pettis *et al*., 2012; Frost *et al*., 2013; Williamson *et al*., 2013; Doublet *et al*., 2015)。有研究表明,亚致死剂量的杀螟硫磷(有机磷)和氯氰菊酯(除虫菊酯)会导致 Na^+/K^+-ATP 酶和神经系统中乙酰胆碱酯酶异常,乙酰胆碱酯酶的异常直接影响蜜蜂的导航定位能力(Papaefthimiou and Theophilidis, 2001; Schmuck, 2004; Claudianos *et al*., 2006; Henry *et al*., 2012)。Frazier 在蜂箱内检测到大量杀菌剂、除草剂、杀虫剂(Kaya *et al*., 2015),这些潜在的毒素严重影响蜜蜂健康,即使按照推荐剂量使用,仍然对蜜蜂有亚致死效应。

乙基多杀菌素和联苯肼酯对防治棚室果蔬的粉虱、蓟马和蚜虫等吸汁类害虫(周浩等, 2017)及红蜘蛛、二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 等蜱螨目害虫有良好的效果(何建红等, 2012),在设施果蔬、草莓生产中使用频繁。乙基多杀菌素是作用机制新颖的大环内酯类生物源农药产品,作用于昆虫体内的烟碱型乙酰胆碱受体(nAchR)和 γ-氨基丁酸(GABA),对靶标害虫速效,能有效防治鳞翅目、双翅目的卫生害虫、缨翅目的蓟马,对蜜蜂毒性较低(Besard *et al*., 2011; Ramanaidu *et al*., 2011)。联苯肼酯作用于螨类的中枢神经传导系统的 γ-氨基丁酸,能有效防治红蜘蛛、二斑叶螨等蜱螨目害虫,对蜜蜂低风险。解毒酶系活性指标是研究农药对蜜蜂影响的常用指标,随着熊蜂授粉应用越来越广泛,农药对熊蜂毒性和行为影响的研究显得尤为重要。因此,本试验理论结合实际,对两种设施常见的低毒农药艾绿士(60 g a.i./L 乙基多杀菌素)和爱卡螨(43% 联苯肼酯)对熊蜂的毒性进行了评估,测定了这两种农药对地熊蜂采集蜂头部乙酰胆碱酯酶、腹部谷胱甘肽-S-转移酶和羧酸酯酶活性的影响,探究这两种农药对熊蜂采集蜂的毒性风险,为我国农药的安全性评价提供数据参考,同时为熊蜂授粉过程中农药的科学使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试熊蜂

地熊蜂 *Bombus terrestris* 由北京市农林科学院植物保护环境保护研究所授粉蜂繁育基地提供,试验所用的地熊蜂为授粉群体中飞出并携带花粉归来的个体大小基本一致的工蜂,即采集蜂。

1.2 供试试剂及主要仪器

Triton X-100、α-乙酸萘酯、毒扁豆碱、固蓝 B 盐、二硝基氯苯(CDNB)、二硫对硝基苯甲酸(DTNB)、还原性谷胱甘肽(GSH)购自美国 Sigma 化学药品公司;7-乙氧基香豆素、磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)以及总蛋白浓度测定试剂盒

（货号 A045-4）和乙酰胆碱酯酶测定试剂盒（货号 A024）购自南京建成生物工程有限公司；其余化学试剂均为国产分析纯。艾绿士为国内市场常见的美国陶氏益农公司产品（农药登记证号 PD20120240，有效成分 60 g a. i. /L 乙基多杀菌素），爱卡螨为美国科聚亚公司登记产品（农药登记证号 PD20090837，43% 联苯肼酯悬浮剂）。酶标仪型号为 Perkin Elmer-EnSpire。

1.3　急性经口毒性测定

1.3.1　试验处理：试验在温度 25 ± 2℃，相对湿度 60%，黑暗条件下进行。用 50% 的蔗糖水溶液将两种药剂分别配制成 5 个剂量系列，其中，60 g a. i. /L 乙基多杀菌素剂量体系为 0.75，1.5，3，6 和 12 μg a. i. /蜂；43% 联苯肼酯的剂量体系为 175，350，700，1 400 和 2 800 μg a. i. /蜂。每个剂量体系设置 3 个重复，每个重复 10 头工蜂。将个体大小基本一致的 400 头采集蜂饥饿处理 2 h，然后将工蜂随机分组移入蜂笼，其中乙基多杀菌素处理组 15 个蜂笼，联苯肼酯处理组 15 个蜂笼，空白对照组 3 个蜂笼。在每个蜂笼的饲喂器中加入蔗糖水稀释的不同剂量的药剂 200 μL，对照组中加入不含药剂的蔗糖水 200 μL，待消耗完后，将各蜂笼饲喂器取出，统一更换不含药剂的蔗糖水进行饲喂，记录 3，12，24，36 和 48 h 熊蜂死亡数量，同时观察不同时间的中毒症状，计算熊蜂死亡率。

死亡率（%）=（死蜂数/总蜂数）×100；

校正死亡率（%）=（处理组死亡率 − 对照组死亡率）/（1 − 对照组死亡率）×100。

1.3.2　毒性划分依据和风险评估方法：测定方法参照国家环境保护局颁布的《化学农药环境安全评价试验准则，第 10 部分：蜜蜂急性毒性试验》（袁善奎等，2014）。农药对地熊蜂的毒性可划分为 4 个等级：LD_{50} ≤ 0.001 μg a. i. /蜂，剧毒；0.001 μg a. i. /蜂 < LD_{50} ≤ 2 μg a. i. /蜂，高毒；2 μg a. i. /蜂 < LD_{50} ≤ 11 μg a. i. /蜂，中毒；LD_{50} > 11 μg a. i. /蜂，低毒。农药对地熊蜂的风险评估参照欧洲和地中海植物保护组织（EPPO，2000）所采用的初步判断农药对蜜蜂生态风险的危害熵（hazard quotient，HQ）值。HQ 值为农药田间推荐用量（AR）（g a. i. /hm^2）与农药对熊蜂急性经口 LD_{50}（μg a. i. /蜂）值的比值：HQ = AR/LD_{50}。HQ > 2 500，高风险；50 < HQ ≤ 2 500，中等风险；HQ ≤ 50，低风险。本文在计算 HQ 值时，LD_{50} 值使用急性经口毒性试验 48 h 的结果，田间推荐剂量按照已在我国农业部登记的同一有效成分田间推荐用量的最大范围来计算。

1.4　总蛋白的测定

分别取成虫头部和腹部按 1∶9（m/v）加入生理盐水，冰水浴条件机械匀浆 2 000 ~ 3 000 r/min 离心 10 min，取上清液稀释至 1% 待用。按照试剂盒（南京建成，货号 A045-4）提示的加样和计算方法获得总蛋白活力数值（U/mg pro）。

1.5　乙酰胆碱酯酶、羧酸酯酶、谷胱甘肽转移酶活性的测定

参考生物测定的结果，采用饲喂法，选取急性经口毒性试验中 48 h 的 LD_{50} 和 LD_{80} 剂量处理的地熊蜂，其中，乙基多杀菌素和联苯肼酯分别设置 LD_{50} 和 LD_{80} 两个处理组，每个处理组 3 个重复，每个重复 10 头采集蜂，另设对照组 3 个重复，每个重复 10 头采集蜂。处理后 3 h 和 24 h 随机挑取存活的地熊蜂个体作为试验样本测定 3 种酶的活性。乙酰胆碱酯酶（acetylcholinesterase，AchE）测定按照试剂盒（南京建成，货号 A024），取成虫头部按 1∶9（m/v）加入生理盐水，冰水浴条件机械匀浆 2 000 ~ 3 000 r/min 离心 10 min，取上清液，加入相应试剂，按照计算方法获得乙酰胆碱酯酶活性；羧酸酯酶（carboxylesterase，CarE）活性测定按照鲁艳辉和高希武（2016）方法进行，底物为 α-乙酸萘酯，以地熊蜂腹部为酶活性测定材料。谷胱甘肽-S-转移酶（glutathione-S-transferase，GST）活性测定按照余慧灵等（2015）方法进行，底物为 2，4-二硝基氯苯，以地熊蜂腹部为酶活性测定材料。

1.6　数据处理

试验记录数据采用 EXCEL 软件统计处理，采用 ANOVA 中的 LSD 多重比较进行分析。数据分析处理使用软件 SPSS20.0 完成，利用线性回归分析方法计算相应的半致死剂量（LD_{50}）。文中全部数据均为平均值 ± 标准误，以 $P < 0.05$ 作为差异显著性标准。

2　结果

2.1　乙基多杀菌素和联苯肼酯对地熊蜂成年工蜂的急性毒性

由表 1 可知，乙基多杀菌素对地熊蜂的急性经口毒性高于联苯肼酯，乙基多杀菌素 24 h 和 48 h 的 LD_{50} 值分别为 11.40 和 3.590 μg a. i. /蜂，联苯肼酯 24 h 和 48 h 的 LD_{50} 值分别为 3 217 和 1 447 μg a. i. /蜂。参照农药对蜜蜂急性经口毒性分级标准，乙基多杀菌素和联苯肼酯对地熊蜂 24 h 经口毒性为低毒，乙基多杀菌素对地熊蜂 48 h 经口毒性为中

表 1 两种农药对地熊蜂成年工蜂的急性经口毒性

Table 1 Acute oral toxicity of two insecticides to adult workers of *Bombus terrestris*

供试药剂 Tested insecticides	处理时间(h) Treatment time	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 Correlation coefficient	LD_{50} ($CL_{0.95}$) (μg a. i. per bee)	毒性等级 Toxicity level
60 g a. i. /L 乙基多杀菌素	24	$y = 1.224 + 1.159x$	0.968	11.40(5.806 – 123.774)	低毒 Low
60 g a. i. /L Spinetoram	48	$y = 0.766 + 1.379x$	0.922	3.590(2.121 – 6.794)	中毒 Moderate
43% 联苯肼酯	24	$y = -0.959 + 1.890x$	0.955	3 217(2 013 – 10 273)	低毒 Low
43% Bifenazate	48	$y = -0.288 + 1.798x$	0.807	1 447(1 005 – 2 518)	低毒 Low

毒,联苯肼酯为低毒。

2.2 乙基多杀菌素和联苯肼酯经口处理后地熊蜂成年工蜂的中毒症状和死亡率

乙基多杀菌素经口处理的地熊蜂采集蜂出现中毒症状的时间较短,10 μg a. i. /蜂的剂量处理后 1 – 2 h出现中毒症状,且中毒症状出现的时间随着剂量的增加而缩短,地熊蜂的前期中毒症状表现为肢体不协调,左右摆动,四肢颤动,翻倒-爬起-翻倒,最后,表现为仰躺在地上挣扎,随着气力的消耗,挣扎幅度越来越小,直到死亡。联苯肼酯经口处理的地熊蜂采集蜂出现中毒症状的时间较晚,2 400 μg a. i/蜂处理后 3 – 5 h 出现中毒症状,明显慢于乙基多杀菌素,中毒症状表现为爬行速度加快,原地打圈或四处乱撞,逐渐微弱,直至死亡。

致死中剂量经口处理地熊蜂结果发现,乙基多杀菌素经口处理的地熊蜂 3 h 死亡率为 24%,而联苯肼酯死亡率上升较慢,3 h 死亡率为 0,显著低于乙基多杀菌素处理,24 h 乙基多杀菌素和联苯肼酯处理引起的死亡率分别上升为 36% 和 28%,差异显著。在之后的 36 h 和 48 h,两种药剂处理组的地熊蜂死亡率差异不显著(图 1)。

2.3 乙基多杀菌素和联苯肼酯对地熊蜂成年工蜂的风险评估

依据农药对蜜蜂生态风险的 HQ 值评估其对熊蜂的风险,由表 2 可以看出两种农药对地熊蜂的 HQ 值均低于 50,表现为低风险。

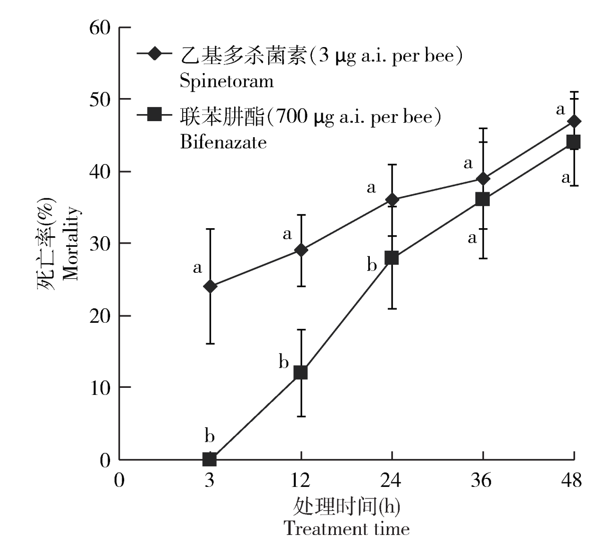


图 1 致死中剂量的乙基多杀菌素和联苯肼酯处理不同时间后地熊蜂采集蜂的死亡率

Fig. 1 Mortality of foragers of *Bombus terrestris* after treatment with spinetoram and bifenazate at the median lethal dose for different time

数据为平均值 ± 标准误;线上不同字母表示经 Duncan 氏新复极差检验差异显著($P < 0.05$)。Data are mean ± *SE*. Different letters above lines indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

表 2 乙基多杀菌素和联苯肼酯对地熊蜂经口危害熵(HQ)值

Table 2 The hazard quotient (HQ) values of spinetoram and bifenazate to foragers of *Bombus terrestris* after oral exposure

供试药剂 Tested insecticides	LD_{50} (μg a. i. per bee)	田间推荐剂量($g\ a.i./hm^2$) Field recommended dose	HQ 值 HQ value
60 g a. i. /L 乙基多杀菌素 60 g a. i. /L Spinetoram	3.590	45.0 – 75.0	12.534 – 20.891
43% 联苯肼酯 43% Bifenazate	1 447	129 – 193.5	0.089 – 0.134

HQ 值为农药田间推荐用量与农药对熊蜂急性经口 LD_{50} 值的比值。HQ value is the ratio of the field recommended dose to the LD_{50} value by oral exposure.

2.4　乙基多杀菌素和联苯肼酯经口处理对地熊蜂成年工蜂乙酰胆碱酯酶、羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响

LD_{50}和LD_{80}剂量的乙基多杀菌素饲喂工蜂成虫 3 h 和 24 h，头部乙酰胆碱酯酶以及腹部羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶活性的变化趋势如图 2 所示。LD_{50}和LD_{80}剂量的乙基多杀菌素处理地熊蜂 3 h 后，AchE 被激活，活性显著高于对照组（$P<0.05$），分别为对照组的 1.45 和 1.23 倍，24 h 后 AchE 活性受到抑制，LD_{50}和LD_{80}剂量处理组均显著低于对照组（$P<0.05$）。CarE 活性在处理后 3 h 同样被激活，活性显著高于对照组（$P<0.05$），LD_{50}和LD_{80}剂量处理组 CarE 活性分别为对照组的 1.24 和 1.53 倍，24 h 后活性受到抑制，其中LD_{50}剂量处理组 CarE 活性显著低于对照组（$P<0.05$），LD_{80}剂量处理组 CarE 活性与对照组差异不显著（$P>0.05$）。GST 活性 3 h 被激活，LD_{50}和LD_{80}剂量处理组 GST 活性显著高于对照组（$P<0.05$），分别为对照组的 2.24 和 2.58 倍，24 h 后 GST 活性受到抑制，但两个剂量处理组 GST 活性仍显著高于对照组（$P<0.05$）。

LD_{50}和LD_{80}剂量的联苯肼酯饲喂地熊蜂工蜂成虫 3 h 和 24 h，头部乙酰胆碱酯酶以及腹部羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶活性的变化见图 3。联苯肼酯处理地熊蜂 3 h 后，LD_{50}和LD_{80}剂量处理组 AchE 活性与对照组差异不显著（$P>0.05$），24 h 后 AchE 活性降低，显著低于对照组（$P<0.05$），分别是对照组的 75% 和 80%。联苯肼酯处理地熊蜂 3 h，LD_{50}剂量处理组 CarE 活性显著低于对照组（$P<0.05$），LD_{80}剂量组 CarE 活性低于对照组，但差异不显著，24 h 后 CarE 活性被激活，其中LD_{50}剂量处理组 CarE 活性高于对照组，但与对照组差异不显著（$P>0.05$），LD_{80}剂量处理组 CarE 活性显著高于对照组（$P<0.05$）。GST 活性 3 h 被激活，LD_{50}剂量组显著高于对照组（$P<0.05$），24 h 后活性降低，但仍显著高于对照组（$P<0.05$），分别为对照组的 2.04 和 1.72 倍。LD_{80}剂量处理组 GST 活性 3 h 与对照组无显著差异（$P>0.05$），24 h 后活性降低，显著低于对照组（$P<0.05$），为对照组的 43%。

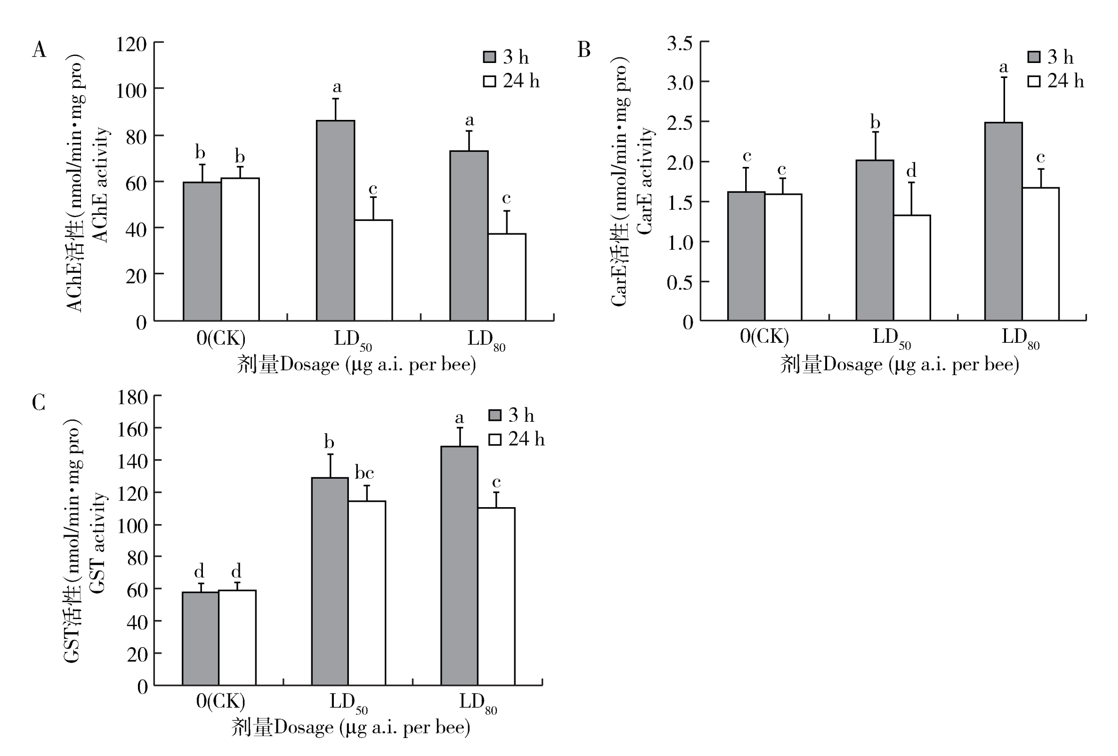


图 2　乙基多杀菌素对地熊蜂成年工蜂头部乙酰胆碱酯酶（A）、腹部羧酸酯酶（B）和谷胱甘肽-S-转移酶（C）活性的影响

Fig. 2　Effect of spinetoram on the AchE activity in the head (A) and the CarE (B) and GST (C) activities in the abdomen of adult workers of *Bombus terrestris*

以不含农药的蔗糖水饲喂组为对照组。数据平均值 ± 标准误；柱上不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著（$P<0.05$）。图 3 同。
Bees fed with sucrose without pesticide were used as the control. Data are mean ± *SE*. Different letters above bars indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$). The same for Fig. 3.

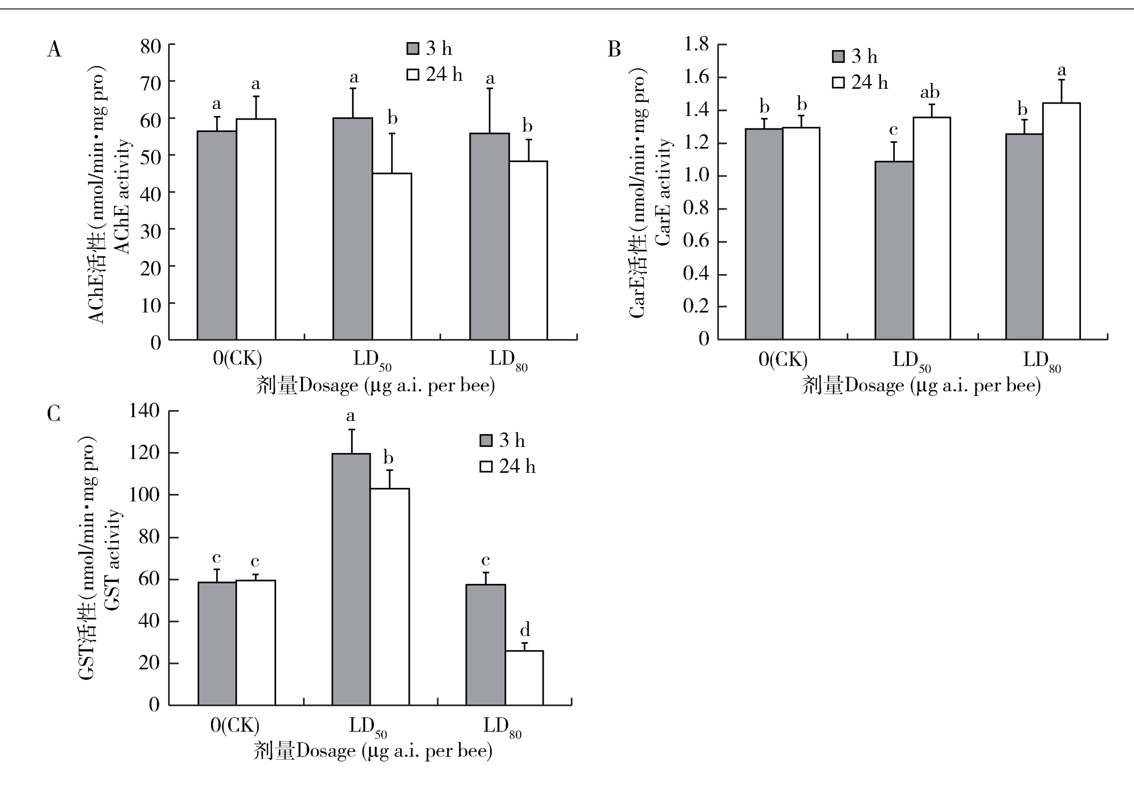


图 3　联苯肼酯对地熊蜂成年工蜂头部乙酰胆碱酯酶(A)、腹部羧酸酯酶(B)和谷胱甘肽-S-转移酶(C)活性的影响

Fig. 3　Effect of bifenazateon on the AchE activity in the head (A) and the CarE (B) and GST (C) activities in the abdomen of adult workers of *Bombus terrestris*

3　讨论

授粉是农作物生产的一个重要环节,为了提高设施农产品的品质和安全性,越来越多的人采用熊蜂授粉取代人工和激素授粉,而农药的使用却影响了熊蜂授粉的效果和其推广应用,为此本试验根据田间农药应用情况,选取两种农业生产中常用的低毒农药,通过经口毒性测定,评估这两种农药对地熊蜂的影响,为农业生产提供依据。评价农药对蜜蜂的安全性一般采用点滴法、喂毒法和熏蒸法等方法,不同测定方法得到的结果往往差异较大(刁青云,2006)。本试验经口毒性测定发现,乙基多杀菌素经口处理的地熊蜂 24 h 的毒性为低毒,而处理 48 h 时表现为中毒,死亡率虽然上升缓慢,但最终死亡率较高,这与前人研究的乙基多杀菌素对切叶蜂致死作用较慢,但最终致死率较高相符(Gradish *et al*., 2012)。联苯肼酯经口处理地熊蜂 24 h 和 48 h 的毒性均为低毒,死亡率在处理初期与乙基多杀菌素差异显著,此外联苯肼酯的亚致死剂量显著高于该药剂推荐使用剂量,经口 HQ 值为 0.089 ~ 0.134,表明联苯肼酯对地熊蜂采集蜂危害极低,在授粉期间可按照推荐剂量使用。

烟碱类农药主要是通过选择性控制昆虫神经系统乙酰胆碱酯酶受体,阻断昆虫中枢神经系统的正常传导,影响蜜蜂的采集行为而导致蜂群正常活动紊乱,采集能力下降,最终导致蜂群的消亡(Johnson, 2015)。试验结果表明,乙基多杀菌素两个剂量处理的地熊蜂经过 3 h 和 24 h,对乙酰胆碱酯酶活性出现了先激活后抑制的现象,说明在处理初期地熊蜂对药剂产生了应激反应,持续上调乙酰胆碱酯酶的表达来解毒,但随着处理时间的延长,药剂在体内积累量超过自身代谢解毒能力,乙酰胆碱酯酶受到抑制,药剂毒性升高,这可能是乙基多杀菌素处理初期熊蜂死亡率上升较为缓慢,但最终死亡率较高的原因。43% 的联苯肼酯处理的地熊蜂初期乙酰胆碱酯酶活性与对照组差异不显著,但随着时间的延长酶活性受到抑制,这可能与联苯肼酯的作用途径与乙基多杀菌素不同有关。

羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶是昆虫代谢抗性涉及的主要酶类,它们通过增强对农药的转化和降解作用来降低农药毒性。本试验结果显示低剂量和高剂量的乙基多杀菌素和联苯肼酯处理均可以诱导 CarE 激活,但随着处理时间的延长,激活效应降

低，活性回归至正常水平。这可能与 CarE 为第一阶段的主要解毒酶有关（Claudianos *et al*., 2006），因此药剂处理初期，CarE 被激活，发挥解毒作用，随着时间的延长，CarE 不能再发挥解毒作用。GST 活性在 LD_{50} 和 LD_{80} 乙基多杀菌素处理后也出现了先升高后降低的现象，但 24 h 的活性仍显著高于对照组，说明 GST 在乙基多杀菌素处理后立即对药剂产生了应激反应，酶活性上升发挥解毒作用，但随着时间的延长，药剂积累量增加，酶活性出现了被抑制现象（Sonoda, 2010; You *et al*., 2013），这可能与 GST 是第二阶段的解毒酶有关。对联苯肼酯处理组 GST 活性，低剂量表现出先激活后降低的现象，高剂量未表现出激活，但在 24 h 出现抑制。原因可能是高剂量处理对 GST 活性在初期就出现了抑制，但在活性数值上与对照组相似，未表现出显著差异，到 24 h 抑制效果显著，从而在数值上表现出差异。

综上所述，联苯肼酯比乙基多杀菌素对地熊蜂的安全性更高，在熊蜂授粉过程中按照推荐剂量应用，不会造成熊蜂急性死亡，但过量施用或者长期施用可能会造成熊蜂体内药剂积累，从而引起熊蜂的生理或者行为产生变化，因此，在应用熊蜂授粉过程中应避免过量或者长期累加使用。乙基多杀菌素对地熊蜂的生态风险评估虽然为低风险，但使用后熊蜂出现中毒症状的时间短、采集蜂中毒症状明显，因此，其在温室及大田使用时对熊蜂的安全性有待进一步研究。

参考文献（References）

Besard L, Mommaerts V, Abdu-Alla G, 2011. Lethal and sublethal side-effect assessment supports a more benign profile of spinetoram compared with spinosad in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Pest Manag. Sci*., 67(5): 541–547.

Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler, MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in honeybee. *Insect Mol. Biol*., 15(5): 615–636.

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848): 283–287.

Dhruba N, 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biol. Conserv*., 142(10): 2369–2372.

Diao QY, 2006. Comparative Study on Toxicological Characteristics of *Apis cerana* and *Apis mellifera*. PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. ［刁青云，2006. 东方蜜蜂和西方蜜蜂的毒理学特性比较研究. 北京：中国农业科学院博士学位论文］

Dogterom MH, Matteoni JA, Plowright RC, 1998. Pollination of greenhouse tomatoes by North American *Bombus vosnesenskii* (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol*., 91(1): 71–75.

Doublet V, Labarussias M, Miranda JRD, Moritz RFA, Paxton RJ, 2015. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ. Entomol*., 17(4): 969–983.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2000. Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products. PP1/170(4): side effects on honeybees. *IOBC/WPRS Bull*., 23: 51–55.

Frost EH, Shutler D, Hillier NK, 2013. Effects of fluvalinate on honey bee learning, memory, responsiveness to sucrose, and survival. *J. Exp. Biol*., 216(15): 2931–2938.

Gabriel E, Roxana CS, Catalina GB, Patricia S, Gastón C, Rodrigo M, 2013. Assessing the impact of the invasive buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris*) on the pollination of the native Chilean herb *Mimulus luteus*. *Arthropod-Plant Interact*., 7(4): 467–474.

Gill RJ, Ramosrodriguez O, Raine NE, 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422): 105–108.

Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL, 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229): 1255957.

Gradish AE, Scott-Dupree CD, Cutler GC, 2012. Susceptibility of *Megachile rotundata* to insecticides used in wild bluberry production in Atlantic Canada. *J. Pest Sci*., 85(1): 133–140.

He JH, Ke HY, Hong WY, Wu YJ, Zhao SF, Shao MH, Cheng SM, Ma WQ, Hong ZH, 2012. Effects of new anti-mite agent such as biphenylhydrazine ester on strawberry spider. *Zhejiang Agric. Sci*., (11): 1546–1548. ［何建红，柯汉云，洪文英，吴燕君，赵帅锋，邵美红，程思明，马卫强，洪智慧，2012. 联苯肼酯等新型杀螨剂对草莓红蜘蛛的控制作用. 浙江农业科学，(11): 1546–1548］

Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A, 2012. A common pesticide decrease foraging success and survival in honeybees. *Science*, 336(6079): 348–350.

Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, Del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol*., 10(10): 2659–2669.

Johnson RM, 2015. Honey bee toxicology. *Annu. Rev. Entomol*., 60: 415–434.

Kaya M, Erdogan S, Mol A, Baran T, 2015. Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. *Int. J. Biol. Macromol*., 72: 797–805.

Lu YH, Gao XW, 2016. Inhibiting effects of common insecticides on

carboxylesterase activity in *Sitobin avenae* and *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) and their synergism to beta-cypermethrin. *Acta Entomol. Sin.*, 59(11): 1151 – 1158. [鲁艳辉, 高希武, 2016. 常用杀虫剂对麦长管蚜和禾谷缢管蚜羧酸酯酶活性的抑制及对高效氯氰菊酯的增效作用. 昆虫学报, 59(11): 1151 – 1158]

Oldroyd BP, 2007. What's killing American honey bees? *PLoS Biol.*, 5(6): e168.

Papaefthimiou C, Theophilidis G, 2001. The cardiotoxic action of the pyrethroid insecticide deltamethrin, the azole fungicide prochloraz, and their synergy on the semi-isolated heart of the bee *Apis mellifera macedonica*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 69(2): 77 – 91.

Pettis JS, vanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G, 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Sci. Nat.*, 99(2): 153 – 158.

Ramanaidu K, Hardman JM, Percival DC, Cutler GC, 2011. Laboratory and field susceptibility of blueberry spanworm (Lepidoptera: Geometridae) to conventional and reduced-risk insecticides. *Crop Prot.*, 30(12): 1643 – 1648.

Schmuck R, 2004. Effect of a chronic dietary exposure of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to imidacloprid. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 47(4): 471 – 478.

Shi R, Liu F, 2016. Quantum chemical study on the stability of honeybee queen pheromone against atmospheric factors. *J. Mol. Model.*, 22(6): 1 – 13.

Sonoda S, 2010. Molecular analysis of pyrethroid resistance conferred by target insensitivity and increased metabolic detoxification in *Plutella xylostella*. *Pest Manag. Sci.*, 66(5): 572 – 575.

Su SK, Zhan Y, Cai F, Liu F, Chen SL, 2007. Advances on colony collapse disorder (CCD) of honeybee. *Apicul. China*, 58(11): 5 – 7. [苏松坤, 湛毅, 蔡芳, 刘芳, 陈盛禄, 2007. 蜂群崩溃失调病(CCD)研究进展. 中国蜂业, 58(11): 5 – 7]

Velthuis HH, Kevan P, 2002. The historical background of the domestication of the bumblebee, *Bombus terrestris*, and its introduction in agriculture. In: Kevan P, Imperatriz Fonseca VL eds. Pollinating Bees – The Conservation Link between Agriculture and Nature. Ministry of Environment, Sao Paulo, Brasil. 177 – 184.

Wang K, Pang Q, Zhang WW, Ji T, 2017. Effects of sublethal doses of carbendazim on the growth and detoxifying enzyme activities of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) larvae. *Acta Entomol. Sin.*, 60(6): 642 – 649. [王康, 庞倩, 张文文, 吉挺, 2017. 多菌灵亚致死剂量对意大利蜜蜂幼虫生长发育和解毒酶系活性的影响. 昆虫学报, 60(6): 642 – 649]

Williamson SM, Baker DD, Wright GA, 2013. Acute exposure to a sublethal dose of imidacloprid and coumaphos enhances olfactory learning and memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Invert. Neurosci.*, 13(1): 63 – 70.

Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS, 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS ONE*, 6(2): e14720.

You MS, Yue Z, He WY, Yang XH, Yang G, Xie M, Zhan DL, Baxter SW, Vasseur L, Gurr GM, Douglas CJ, Bai J, Wang P, Cui K, Huang S, Li X, Zhou Q, Wu Z, Chen Q, Liu C, Wang B, Li X, Xu X, Lu C, Hu M, Davey JW, Smith SM, Chen M, Xia X, Tang W, Ke F, Zheng D, Hu Y, Song F, You Y, Ma X, Peng L, Zheng Y, Liang Y, Chen Y, Yu L, Zhang Y, Liu Y, Li G, Fang L, Li J, Zhou X, Luo Y, Gou C, Wang J, Wang J, Yang H, Wang J, 2013. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nat. Genet.*, 45(2): 220 – 225.

Yu HL, Xiang X, Yuan GX, Chen YQ, Wang XG, 2015. Effects of sublethal doses of cyantraniliprole on the growth and development and the activities of detoxifying enzymes in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(6): 634 – 641. [余慧灵, 向兴, 袁贵鑫, 陈羿渠, 王学贵, 2015. 溴氰虫酰胺亚致死剂量对甜菜夜蛾生长发育及体内解毒酶活性的影响. 昆虫学报, 58(6): 634 – 641]

Yuan SK, Xu H, Qu WG, Shan ZJ, Bu YQ, Yan QP, Wang HL, 2014. GB/T 31270.10-2014. Test Guidelines on Environmental Safety Assessment for Chemical Pesticide, Part 10: Acute Toxicity Test of Bees. Standards Press of China, Beijing. [袁善奎, 徐晖, 瞿唯钢, 单正军, 卜元卿, 严清平, 王会利, 2014. GB/T 31270.10-2014. 化学农药环境安全评价试验准则. 第 10 部分: 蜜蜂急性毒性试验. 北京: 中国标准出版社]

Zhou H, Shao JN, Zhai YF, Wu GA, Chen H, Men XY, Yu Y, Zheng L, 2017. Toxicity and risk assessment of sulfoxaflor, spinetoram and their mixture to *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomol. Sin.*, 60(7): 809 – 816. [周浩, 邵莒南, 翟一凡, 吴光安, 陈浩, 门兴元, 于毅, 郑礼, 2017. 氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂对地熊蜂的毒性及风险评估. 昆虫学报, 60(7): 809 – 816]

(责任编辑: 赵利辉)